

PRIORITY DOCUMENT



REC'D	0 4 FEB 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Eberhard-Karls-Universität Tübingen Universitätsklinikum in Tübingen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material"

am 22. Oktober 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 H und C 12 Q der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Januar 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Zeichen: 196 43 486.6

Hof

Anmelderin:

Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
Universitätsklinikum
Geissweg 3

72076 Tübingen

21. Oktober 1996
5402P132 HO/CR-km

Vertreter:

Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil
Patentanwälte
Rotebühlstraße 121
70178 Stuttgart

Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen
in klinischem Material

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material.

Das Interesse allgemein an Verfahren zum Nachweis von Pilzzellen ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß insbesondere in den letzten Jahren Pilzspezies als nosokomiale Pathogene eine erhebliche Bedeutung bei immunsupprimierten Patienten erlangt haben.

Die bisher bekannten Verfahren zur Analyse von Pilzinfektionen zielen vor allem darauf ab, eine Diagnose der Pilzinfektion und eine Identifizierung der pathogenen Pilzspezies zu ermöglichen. Dazu bedient man sich z.B. einer Anzüchtung von Pilzspezies aus klinischem Material auf geeigneten Nährmedien und ggf. molekularbiologischer Verfahren.

Zu den medizinisch bedeutsamsten fakultativ pathogenen Pilzgattungen zählt die zu den Fungi imperfecti gehörende Gattung *Candida*. Sie ruft die sogenannten Candida-Mykosen, auch Candidosen genannt, hervor. Der wichtigste Erreger innerhalb der Gattung *Candida* ist dabei die Spezies *Candida albicans*, die neben den meist weniger schwerwiegend verlaufenden Infektionen der Haut und Schleimhäute auch tiefe Organ-Mykosen oder System-Mykosen hervorruft. Unter System-Mykosen versteht man Pilzinfektionen, von denen nicht nur die Haut oder Schleimhäute, sondern auch weitere Organe, Organsysteme oder sogar der ganze Organismus betroffen sind. Im letzteren Fall spricht man auch von "generalisierten" Pilzinfektionen.

Der Erregernachweis bei System-Mykosen ist außerordentlich problematisch und erfolgt in der Praxis häufig erst post mortem. Eine wesentliche Verbesserung haben hier molekularbiologische Analyseverfahren gebracht, mit deren Hilfe es möglich ist, schnell und zuverlässig Pilzinfektionen nachzuweisen und verschiedene Pilzspezies voneinander zu unterscheiden.

In der Veröffentlichung "Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species" von Niesters et al. (1993), *Journal of Clinical Microbiology*, Seiten 904 bis 910, wird ein auf der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) beruhendes Verfahren beschrieben, mit dem verschiedene *Candida*-Spezies nachgewiesen und differenziert werden können.

Bei diesem Verfahren werden die Pilz-spezifischen Nukleinsäuren zunächst aus klinischem Material extrahiert und danach weiter analysiert. Zur Analyse wird der 18ssuRNA-Genbereich näher untersucht. Mit Hilfe geeigneter Primer wird dazu ein Abschnitt dieses Genbereichs in der PCR amplifiziert und die daraus hervorgehenden PCR-Produkte werden entweder sequenziert, mit Hilfe von Restriktionsenzymen analysiert oder mit spezifischen Hybridisierungssonden hybridisiert. Im letzteren Fall werden die Hybridisierungssonden durch Einbau radioaktiver Nukleotide markiert und durch Autoradiographie nachgewiesen. Aufgrund der Sequenzen, der Restriktions- oder Hybridisierungsmuster können dann verschiedene Candida-Spezies voneinander unterschieden werden.

Ein weiteres Verfahren, mit dem Candida albicans-Infektionen diagnostiziert werden können, ist in der Veröffentlichung "Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of Candida albicans by in vitro amplification of a fungus specific gene" von Buchman et al. (1990), Surgery 108, Seiten 338 bis 347, beschrieben.

Bei diesem Verfahren erfolgt der Nachweis einer Candida albicans-Infektion durch PCR-Amplifikation eines anderen Pilz-spezifischen Genbereiches, nämlich des Gens für das Enzym 14- α -Lanosterol-Demethylase.

Die PCR-Produkte werden hier nicht durch Hybridisierung, sondern durch Auftrennung im Agarose-Gel und Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid nachgewiesen.

In beiden oben beschriebenen Verfahren werden molekularbiologische Techniken dazu eingesetzt, Pilzinfektionen in Patientenmaterial nachzuweisen und, wie in der Publikation von Niesters

beschrieben, zusätzlich verschiedene Spezies der Gattung *Candida* voneinander zu unterscheiden.

Ist die systemische Pilzinfektion einmal nachgewiesen, so kann sie mit verschiedenen Antimykotika, also das Wachstum von Pilzen hemmenden Mitteln, bekämpft werden. Die zur systemischen Anwendung eingesetzten Wirkstoffe sind dabei Azolderivate, das Polyen Amphotericin B, Flucytosin, Griseofulvin und Terbinafin. Dabei sind die überlicherweise eingesetzten Antimykotika die Azolderivate, zu denen bspw. das Fluconazol gehört.

Durch den häufigen Einsatz dieser Klasse der Antimykotika bilden sich in jüngster Zeit resistente Pilzstämme aus, deren Wachstum mit diesen Therapeutika nicht mehr gehemmt werden kann. Von dem Einsatz dieses Mittels kann jedoch nicht allgemein abgesehen werden, da es neben der guten Wirksamkeit gegen System-Mykosen im Gegensatz zu den anderen Antimykotika nur geringe und darüber hinaus harmlose Nebenwirkungen hervorruft. Das wesentliche Problem dabei ist, daß solche Resistenzen nicht frühzeitig erkannt werden können, da keine schnellen Tests zur Überprüfung des Vorliegens von resistenten Pilzzellen zur Verfügung stehen.

So werden zunächst Azolderivate als "Mittel der Wahl" gegeben, wobei dann nur daraus, daß sich beim Patienten trotz hoher Dosierung und langanhaltender Behandlung keine Besserung einstellt, geschlossen werden kann, daß er mit Azolderivat-resistenten Pilzzellen infiziert ist. Häufig wird diese Diagnose erst dann gestellt, wenn der Infektionsverlauf beim Patienten trotz Behandlung mit den hier jedoch unwirksamen Azolderivaten einen dramatischen Verlauf nimmt.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zu schaffen, mit dem gegen Azolderivate resistente Pilzzellen spezifisch nachgewiesen werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren mit den folgenden Schritten gelöst:

- a) Extraktion von Pilz-spezifischen Nukleinsäuren aus klinischem Material; und
- b) Hybridisierung der Pilz-spezifischen Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die gegen Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.

Durch die Hybridisierung Pilz-spezifischer Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die spezifisch Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen, nicht jedoch solche aus Azolderivat-sensitiven Pilzzellen erkennen, wird das Auffinden resistenter Pilzstämme jetzt einem schnellen, reproduzierbaren und einfach durchzuführenden molekularbiologischen Verfahren zugänglich gemacht. Damit kann in kurzer Zeit und ausgehend von geringen Mengen klinischen Materials ein Nachweis erfolgen. Bei positivem Befund, also dem Vorliegen resistenter Pilzstämme, kann dann auf ein anderes Antimykotikum übergegangen werden, mit dem die Pilzinfektion letztlich bekämpft wird.

Zu diesem Verfahren können Pilz-spezifische Nukleinsäuren vorzugsweise aus Blut, jedoch auch aus Biopsiematerial, Sputum, Schleimhautabstrichen oder sonstigem Patientenmaterial extrahiert werden.

Dabei kann entweder die Pilz-spezifische DNA oder RNA isoliert werden, die dann durch DNA/DNA-, DNA/RNA- oder RNA/RNA-Hybridisierung nachgewiesen werden.

Es ist möglich, die Hybridisierung in Lösung oder an festen Trägern, wie beispielsweise Membranen oder Säulen, nachzuweisen, wobei die verwendeten Hybridisierungssonden radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert und dann die spezifische Hybridisierung durch Autoradiographie bzw. Enzym-katalysierte Farbreaktionen detektiert werden.

Somit wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe vollkommen gelöst.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es bevorzugt, wenn die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen gerichtet sind.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich zeigen, daß bei Pilzspezies, die eine Resistenz gegenüber Azolderivaten aufweisen, Mutationen in dieser Genregion der Pilz-DNA auftreten, die überraschenderweise hochsignifikant mit dem klinischen und mikrobiologischen Befund einer Azolderivat-Resistenz korrelieren.

Eine mögliche Erklärung für diese Korrelation geht von der Erkenntnis aus, daß die Azolderivate die Ergosterolsynthese von Pilzen hemmen. Ergosterol ist ein Steroid, das in das sogenannte Plasmalemma, die Phospholipidschicht, die der Zellwand der Pilze innen anhaftet, eingelagert wird. Ergosterol wird in der Zelle aus Lanosterol, einer Vorstufe, synthetisiert. Der entscheidende Schritt bei der Ergosterolsynthese aus Lanosterol wird von dem Enzym 14- α -Lanosterol-Demethylase, kurz 14-DM, katalysiert.

Da das Ergosterol ein essentieller Baustein des Plasmalemmas ist, kann in Abwesenheit von Ergosterol keine Zellteilung mehr stattfinden. Für Zellteilungen ist immer eine Neusynthese von Zellwand und Plasmalemma notwendig.

Weil das Steroid Ergosterol spezifisch bei Pilzen, nicht jedoch bei menschlichen Zellen oder Bakterien auftritt, kann die Inhibition der für das Wachstum der Pilzzellen essentiellen Ergosterol-Synthese erfolgreich zur Bekämpfung von Pilzinfektionen eingesetzt werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit von Vorteil, daß Hybridisierungs-Sonden gegen das Gen eingesetzt werden, das für das Protein codiert, an dem die Azolderivate direkt angreifen. Bei den resistenten Pilzzellen treten in diesem Gen gehäuft Änderungen der Nukleinsäure-Sequenz auf. Die spezifischen Hybridisierungssonden sind dann so ausgelegt, daß sie diese Sequenzänderungen erkennen, also nur an Genabschnitte von Pilzzellen binden, die eine Resistenz gegen Azolderivate aufweisen.

Bei diesem Verfahren ist es weiterhin bevorzugt, wenn die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen der Spezies *Candida albicans* gerichtet sind. Dieses Gen wird bei *Candida albicans* auch ERG16-Gen genannt.

Hierbei ist von Vorteil, daß die Hybridisierungssonden es möglich machen, resistente Stämme der am weitesten verbreiteten pathogenen Pilzspezies, nämlich *Candida albicans*, zu diagnostizieren.

In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zwischen Schritt a) und b) eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der Abschnitte des 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gens amplifiziert werden.

Diese Maßnahme hat also den Vorteil, daß das Verfahren sowohl an Sensitivität als auch an Spezifität gewinnt, da große Mengen an Ausgangsmaterial erzeugt werden, in dem spezifisch nur der benötigte Genabschnitt enthalten ist. Das mit PCR amplifizierte Material wird dann z.B. in die Southern-Hybridisierung eingesetzt.

In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, wenn in der PCR-Reaktion als Primerpaare die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 oder die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 eingesetzt werden.

Dabei ist vorteilhaft, daß nach Erkenntnis der Erfinder mit diesen Primerpaaren DNA-Abschnitte amplifiziert werden, in denen für resistente Pilzspezies charakteristische DNA-Sequenzen enthalten sind. Die dabei entstehenden Amplifikationsprodukte sind deutlich kürzer als das ganze Gen und ermöglichen somit eine einfachere Weiterverarbeitung.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es weiterhin bevorzugt, wenn in Schritt b) eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 des beiliegenden Sequenzprotokolls als Hybridisierungssonden eingesetzt werden.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß mit diesen Hybridisierungssonden überraschenderweise resistente Candida-Spezies, deren Resistenz nur durch jeweils einen einzelnen Basenaustausch im ERG16-Gen zustandegekommen ist, von sensitiven Stämmen, die diese Mutation nicht aufweisen, unterschieden werden können.

In einer vorteilhaften Ausführung werden in Schritt b) die Hybridisierungssonden mit Digoxigenin markiert und in die Southern-Hybridisierung eingesetzt. Der Nachweis einer spezifischen Hybridisierung erfolgt dann durch Enzym-konjugierte Anti-Digoxigenin-Antikörper, wobei die Enzyme Farbreaktionen katalysieren.

Hierbei ist von Vorteil, daß die Markierung der Hybridisierungssonden nicht radioaktiv erfolgen muß. Außerdem können große Mengen an Hybridisierungssonden gleichzeitig markiert werden, die dann aliquotiert und bei -20°C gelagert werden können, da sie über lange Zeit stabil sind. Für die individuellen Nachweisreaktionen können dann Aliquots aus der gleichen Markierungsreaktion aufgetaut und eingesetzt werden, so daß eine hohe Reproduzierbarkeit über lange Zeiträume hinweg gewährleistet ist.

Selbstverständlich sind jedoch auch radioaktive Markierungsmethoden und weitere nicht-radioaktive Markierungsmethoden, wie bspw. die Markierung mit Biotin möglich.

Bei der Southern-Hybridisierung ist vorteilhaft, daß die zu analysierende Nukleinsäure schnell auf eine Membran, bspw. eine Mikrozellulose- oder Nylonmembran aufgebracht werden kann. Die schnellste Methode ist dabei die dem Fachmann geläufige "Blot-Blot" oder "Dot-Blot"-Methode:

Es ist jedoch auch möglich, die zu analysierende DNA zunächst im Agarose-Gel aufzutrennen und erst dann auf die Membran zu transferieren.

Die Pilz-DNA kann direkt, oder zuvor durch PCR amplifiziert in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden.

Es versteht sich jedoch, daß es auch möglich ist, Pilz-spezifische RNAs zu analysieren. Diese können entweder direkt aus dem Zytoplasma von Pilzzellen isoliert werden, oder erst durch Reverse Transkription hergestellt werden. Die Analyse kann dann durch Northern-Blot oder weitere RNA-Nachweisreaktionen erfolgen.

Die Hybridisierung muß nicht auf Membranen, wie bspw. bei Southern- oder Northern-Hybridisierung, erfolgen, sondern kann auch in Lösung oder an Säulen durchgeführt werden.

Wenn in Schritt b) die Hybridisierungssonden mit den Nukleinsäure-Sequenzen SEQ ID-No: 4 bis 8 eingesetzt werden, ist es bevorzugt, wenn nach dem Hybridisieren ein Waschschriff bei einer Temperatur durchgeführt wird, die um ca. 1°C unter der Schmelztemperatur (T_m) der jeweils eingesetzten Hybridisierungs-sonde liegt.

Hierbei ist von Vorteil, daß in diesem Waschschriff wegen der relativ hohen Temperatur nur solche Doppelstrang-Regionen stabil sind, die keine Fehlpaarung aufweisen. Somit werden alle gepaarten Hybridisierungssonden, deren DNA-Sequenzen nicht völlig mit dem entsprechenden Pilz-DNA-Abschnitt übereinstimmen, in dem Waschschriff gewaschen und geben daher in der Nachweisreaktion kein Signal mehr. Ein Signal wird auf diese Art und Weise nur dann erhalten, wenn die Pilz-DNA aus einer resistenten Pilzzelle stammt, in der die Mutation enthalten ist.

Auf diese Weise ist es also möglich, mit Hilfe der spezifischen Hybridisierungssonden Genabschnitte zu unterscheiden, die nur in einer einzigen Base voneinander abweichen.

Die Erfindung betrifft ferner die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und 2 als Primer für die PCR-Reaktion und die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 und/oder 6 als Hybridisierungs sonden in das Verfahren zur Detektion von Azolderivat-resistenten Pilzzellen eingesetzt werden.

Außerdem ist bevorzugt, wenn die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und 4 als Primer und die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 oder 8 als Hybridisierungs sonden in das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden.

Diese Maßnahme hat den Vorteil, daß auf diese Art und Weise zunächst in der PCR ohne Schwierigkeiten amplifizierbare, leicht handhabbare DNA-Fragmente von 300 - 400 Basenpaaren in großen Mengen bereitgestellt werden, und danach die ggf. in diesen PCR-Fragmenten enthaltenen Basenaustausche mit den Hybridisierungs sonden identifiziert werden können.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich zeigen, daß in Azolderivat-resistenten Pilzstämmen eine Reihe von einzelnen Basenaustauschen gegenüber den Azolderivat-sensitiven Pilzstämmen auftreten. So führt ein Basenaustausch von T nach G im ERG16-Gen dazu, daß die Aminosäure Phenylalanin Nr. 105 des Enzyms 14-DM zu einem Leucin mutiert wird. Dieser T/G-Austausch ist auf Genebene mit Hilfe der Hybridisierungs sonde mit der Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 5 nachzuweisen. Weiterhin haben die Erfinder erkannt, daß bei resistenten Pilzstämmen ein Basenaustausch von A nach C auftreten kann, wodurch die Aminosäure Glutamin Nr. 142 zu einem Prolin mutiert wird. Diese Mutation ist mit Hilfe der Hybridisierungs sonde mit der Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 6 detektierbar. Darüber hinaus wurden zwei weitere Basenaustausche, beide von G nach A, gefunden. Dies führt dazu, daß das Glycin Nr. 464 der 14-DM zu einem Serin

und das Valin Nr. 488 zu einem Isoleucin mutiert wird. Diese beiden Punktmutationen werden mit den Hybridisierungssonden mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 bzw. 8 nachgewiesen.

Da resistente Pilzstämme auf dem spezifisch amplifizierten PCR-Fragment entweder eine oder mehrere der Basenaustausche enthalten, ist es vorteilhaft, wenn die entsprechenden Hybridisierungssonden gleichzeitig in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden. Bei einem positiven Signal liegt dann in jedem Fall eine resistente Pilzspezies vor. Wird nur mit einer der Hybridisierungssonden hybridisiert, so kann man nachweisen, welche Mutation bei diesem resistenten Pilzstamm aufgetreten ist und ob eine oder mehrere Mutationen vorliegen.

Es versteht sich jedoch, daß als Primer auch die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 4 kombiniert werden können, so daß dann auf dem amplifizierten PCR-Fragment von ca. 1.400 Basenpaaren alle mit den Hybridisierungssonden mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 detektierbaren Mutationen enthalten sind.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Analyse von Pilzinfektionen mit Azolderivat-resistenten Pilzstämmen, wobei in diesem Kit eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 enthalten sind.

Ein solcher Kit hat den Vorteil, daß das Verfahren besonders schnell und einfach durchzuführen ist, da das durchführende Labor sich die Primer und Hybridisierungssonden nicht erst selbst herstellen lassen muß.

Außerdem können in dem Kit sämtliche erforderlichen Lösungen zur Durchführung der PCR-Reaktion und der Hybridisierung

enthalten sein. Dadurch wird es möglich, das erfindungsgemäße Verfahren auch in einem Routinelabor von angelernten Kräften durchführen zu lassen. Außerdem kann das Verfahren schnell und ohne langwierige Vorbereitungen mit hoher Reproduzierbarkeit durchgeführt werden, wenn alle benötigten Stoffe für viele Reaktionen in dem Kit bereitgestellt werden.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Beispiele für die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte sind in der folgenden Beschreibung angegeben.

Beispiel 1: Anzucht von Candida albicans-Stämmen

Zur Analyse und zum Vergleich resistenter Candida albicans-Stämme mit sensitiven Candida albicans-Stämmen werden Patienten-Material oder Hefe-Proben für 48 Stunden bei 30°C auf einem zur Hefeanzucht standardmäßig verwendeten Medium, dem Sabouraud-Glukose-Agar, bebrütet. Danach werden mehrere Kolonien abgeimpft und in steriler 0,9-%iger Natriumchloridlösung aufgenommen.

Beispiel 2: Aufschließen der Pilzzellen und Isolation der Pilz-DNA

Der Aufschluß der Pilzzellen erfolgt durch alkalische Lyse (50 mM NaOH, 10 Minuten, 95°C) und darauf folgende Neutralisation und enzymatische Behandlung mit Zymolyase der Firma Sigma. Die Denaturierung der Proteine wird in Tris/EDTA und 10%-iger SDS-Lösung bei 65°C durchgeführt.

In der nunmehr vorliegenden Lösung befinden sich Trümmer der Pilzzellen sowie freie Pilz-DNA, die nun isoliert werden muß.

Hierzu erfolgt zunächst eine Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumacetat und eine Fällung der DNA durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol. Das Fällungsprodukt wird für die weiteren Verfahrensschritte verwendet.

Beispiel 3: Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus dem ERG16-Gen

Die PCR-Reaktion dient dazu, zunächst Abschnitte aus dem ERG16-Gen zu amplifizieren, an die die spezifischen Hybridisierungs-sonden binden. So wird das insgesamt 1851 bp lange ERG16-Gen in leicht handhabbare und ohne Schwierigkeiten in der PCR amplifizierbare Abschnitte unterteilt.

Wenn als Hybridisierungssonde die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 5 und/oder 6 eingesetzt werden soll, wird eine PCR mit Primern mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 (Upstream Primer) und 2 (Downstream Primer) durchgeführt.

Mit den genannten Primern wird dann ein PCR-Produkt erhalten, das den Bereich von Base 379 bis Base 676, also ca. 300 Basen-paare des ERG16-Gens umfaßt.

Wenn als Hybridisierungssonden die DNA-Sequenzen SEQ ID-No: 7 und/oder 8 eingesetzt werden sollen, werden in die PCR Primer mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 (Upstream Primer) und 4 (Downstream Primer) eingesetzt.

Mit diesen Primern wird der Bereich von Base 1360 bis Base 1774 des ERG16-Gens, also ein ca. 400 Basenpaar-Fragment, amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen sind dabei die folgenden:

Puffer (50 μ l):
10 mM Tris pH 9,6
50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
0,2 mg/ml BSA
Polymerase
je 0,5 mM Nukleotide
je 100 pM Primer
Anfängliche Denaturierung: 3 min bei 94°C
Zyklus-Denaturierung: 0,5 min bei 94°C
Annealing: 1 min bei 62°C
Extension: 2 min bei 72°C
Terminale Extension: 5 min bei 72°C
Zykluszahl: 34

Die hohe Magnesiumkonzentration im Puffer sorgt für eine hohe Spezifität der Polymerase, die mit 72°C im Extensions-Schritt bei ihrem Temperaturoptimum arbeiten kann.

Durch die PCR-Reaktionen wird Ausgangsmaterial in genügend großer Menge erhalten, um nun weiter zu analysieren, ob die DNA aus resistenten oder sensitiven Pilzzellen stammt.

Die Lage der Primer und der Hybridisierungssonden auf dem ERG16-Gen sind in der am Schluß der Beschreibung aufgeführten Tabelle I enthalten.

Beispiel 4: Southern-Hybridisierung der PCR-Fragmente

Die in Beispiel 3 erhaltenen PCR-Produkte werden hitzedenaturiert und auf Nylonmembranen aufgebracht, bspw. in dem dem Fachmann geläufigen Slot-Blot-Verfahren eingesetzt. Auf der Nylonmembran wird die DNA vernetzt. Die Markierung der Hybridisierungssonden erfolgt durch Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide in Verfahren, die dem Fachmann geläufig sind (bspw. "Nick-translation" oder Random priming).

Die auf der Membran immobilisierte DNA wird dann zunächst für 20 Minuten mit 0,4 N NaOH denaturiert und danach mit 2 x SSPE (1 x SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,7) neutralisiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgt für 20 Minuten in 6 x SSPE, 5 x Denharts-Lösung, 0,1 % N-Lauryl-Sarcosin-Na, 0,02 % SDS bei 42°C.

Die Hybridisierung wird danach in der oben beschriebenen Prähybridisierungslösung durchgeführt, der 30 pM digoxigenierte Hybridisierungssonde zugesetzt wurde, und zwar für 20 Minuten bei 42°C. Als Hybridisierungssonde werden eine oder mehrere der Sequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8, einzeln, aufeinanderfolgend oder mehrere zugleich eingesetzt.

Die Spezifität der Hybridisierung wird durch dann erfolgende Waschschrte bestimmt. Die ersten beiden Waschschrte werden für 5 Minuten in 2 x SSPE, 0,1 % SDS bei 42°C durchgeführt. Dann werden zwei Waschschrte jeweils für 7 Minuten in 6 x SSPE, 1 % SDS durchgeführt, wobei die Waschttemperatur in etwa, vorzugsweise genau um 1°C unter dem T_m-Wert liegt.

Die Schmelztemperaturen der Hybridisierungssonden sowie die durch die Hybridisierungssonden detektierbaren Basenaustausche sind in Tabelle I angegeben.

Stimmt die Nukleotidsequenz der Hybridisierungssonde nicht exakt mit der entsprechenden Sequenz des PCR-Fragments überein, so wird die Hybridisierungssonde in diesem Schritt gewaschen.

Anschließend wird die Nachweisreaktion durchgeführt, bei der untersucht wird, ob digoxigenierte Hybridisierungssonde auf der Membran enthalten ist oder nicht. Dies erfolgt in einem Verfahren nach dem Herstellerprotokoll der Firma Boehringer Mannheim mit Hilfe Enzym-konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper. Das Enzym katalysiert dann eine Reaktion, die zur Erzeugung eines unlöslichen Farbkomplexes führt.

Hat eine der spezifischen Hybridisierungssonden mit den Sequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 spezifisch mit der Pilz-DNA aus klinischem Material hybridisiert, so sind bei dem Patienten Pilzzellen enthalten, die gegen Azolderivate resistent sind. Bei einer Infektion mit solchen Pilzzellen ist eine Therapie mit Azolderivat-Antimykotika also sinnlos und die Therapie zur Bekämpfung der Candida-Infektion muß umgestellt werden.

Tabelle I:

Nukleotidsequenz	Art	Bindungsstelle auf ERG16-Gen (nt)	Länge der Nukleotid- sequenz (nt)	Länge des PCR- Fragmentes (bp)	T _m [°C]	Basen- austausch
SEQ ID-No: 1	Upstream-Primer	379-400	21	297	-	-
2	Downstream-Primer	657-676	19		-	-
3	Upstream-Primer	1360-1383	23	414	-	-
4	Downstream-Primer	1751-1774	23		-	-
5	Hybridisierungs-Sonde	448-747	30	-	74°C	T → G
6	Hybridisierungs-Sonde	557-584	28	-	74°C	A → C
7	Hybridisierungs-Sonde	1522-1551	30	-	82°C	G → A
8	Hybridisierungs-Sonde	1597-1628	32	-	76°C	G → A

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Universitätsklinikum
STRASSE: Geissweg 3
ORT: Tübingen
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 72076
TELEFON: 07071-29-1
TELEFAX: 07071-293966

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nachweis von resistenten
Pilzzellen

ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: (folgt)
COMPUTER:
BETRIEBSSYSTEM:
SOFTWARE:

DATEN DER ANMELDUNG:

ANWALTSAKTE: 5402P132

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 21 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:1:

AAGTATGGTG ATGTATTTTC A

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 19 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:2:

AAACTTTCAT CAGTAACAA

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:3:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 23 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:3:

TCTCCAGGTT ATGCTCATAC TAG

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 23 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:4:

AACAAATCAGA ACACTGAATC GAA

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 30 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:5:

TCATGAATTT GTTTTGAATG CTAAATTATC

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 28 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:6:

CCAGATTAAT GGAACCAAAA AAATTTGC

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 30 Basenpaare
ART: Nukleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:7:

CCTTATTTAC CATTTAGTGG TGGTAGACAT

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 32 Basenpaare

ART: Nukleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:8:

TTAACTACTT TTATTTATAA TTAAAGATGG AC

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material, mit den Schritten:
 - a) Extraktion von Pilz-spezifischen Nukleinsäuren aus klinischem Material; und
 - b) Hybridisierung der Pilz-spezifischen Nukleinsäuren mit Hybridisierungssonden, die gegen Nukleinsäure-abschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen gerichtet sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden gegen einen DNA-Abschnitt aus dem 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gen (ERG16-Gen) der Spezies *Candida albicans* gerichtet sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Schritt a) und b) eine PCR-Reaktion durchgeführt wird, in der Abschnitte des 14- α -Lanosterol-Demethylase-Gens amplifiziert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR-Reaktion als Primerpaare die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 oder die Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 bis 8 des beiliegenden Sequenzprotokolls als Hybridisierungs-sonde eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) die Hybridisierungs-sonden mit Digoxigenin markiert werden und in die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Hybridisieren zumindest ein Waschschr-itt bei einer Temperatur durchgeführt wird, die um ca. 1°C unter der Schmelztemperatur (T_m-Wert) der jeweils eingesetzten Hybridisierungs-sonde liegt.
9. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 1 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
10. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 2 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
11. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 3 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
12. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 4 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
13. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 5 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.
14. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 6 aus dem beiliegenden Sequenz-protokoll.

15. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 7 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
16. Nukleotidsequenz SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
17. Verwendung der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 als Primer und der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 5 und/oder SEQ ID-No: 6 als Hybridisierungssonden in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7.
18. Verwendung der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 und SEQ ID-No: 4 als Primer und der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 7 und/oder SEQ ID-No: 8 als Hybridisierungssonden in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7.
19. Kit zur Analyse von Pilzinfektionen mit Azolderivat-resistenten Pilzstämmen, dadurch gekennzeichnet, daß er eine oder mehrere der Nukleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 bis 8 aus den Ansprüchen 9 bis 16 enthält.
20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

Zusammenfassung

In einem Verfahren zum Nachweis von resistenten Pilzzellen in klinischem Material werden zunächst Pilz-spezifische Nukleinsäuren aus klinischem Material extrahiert und danach mit Pilz-spezifischen Hybridisierungssonden hybridisiert, die gegen Nukleinsäureabschnitte aus Azolderivat-resistenten Pilzzellen gerichtet sind.

